

DIOGO NUNO BRANDÃO DE MELO BEIRÃO

# Hepcidina: Biomarcador do Metabolismo do Ferro e de Doença

## Artigo de Revisão Bibliográfica

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Ano letivo 2015/16

### **ORIENTADORA:**

Prof. Dra. Maria Luciana Gomes de Pinho  
Categoria: Professora Auxiliar Convidada

### **CO-ORIENTADORA:**

Professora Doutora Maria da Graça Beça Gonçalves Porto  
Categoria: Professora Catedrática Convidada

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Rua de Jorge Viterbo Ferreira nº 227, 4050-313 Porto

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Dra. Luciana Pinho por todo o apoio dado desde o primeiro dia, por todo o tempo disponibilizado na leitura e revisão das múltiplas versões desta tese de mestrado e pelas múltiplas sugestões dadas, de modo a proporcionar o ambiente necessário para redigir o melhor produto final possível.

Gostaria de demonstrar o meu agradecimento à Professora Doutora Graça Porto pelo seu apoio e entusiasmo a partir do momento em que propus o tema, pelo tempo disponibilizado na leitura e revisão dos múltiplos rascunhos e pelos múltiplos conselhos dados, para melhorar continuamente esta revisão bibliográfica.

Quero agradecer à minha família por todo o meu apoio dado, em especial aos meus pais pela ajuda da escolha da melhor temática a abordar, por me terem demonstrado a importância de iniciar este trabalho o mais precocemente possível, por me terem dado força para continuar sempre a dar o meu melhor e para não fracassar nos momentos mais desesperantes.

Por último, quero agradecer à minha namorada Ana por me dar força sempre que precisava, por estar sempre ao meu lado nos bons e maus momentos, por me ajudar a tomar as decisões mais corretas. Obrigado por tudo! ☺

## ABREVIATURAS E SIGLAS

AEE – Agentes Estimuladores da Eritropoiese  
ASO - *Anti-Sense Oligonucleotide*  
ATOH8 – *Atonal Homologue 8*  
BMP - *Bone Morphogenetic Protein*  
BMPR - *Bone Morphogenetic Protein Receptor*  
BMP-SMAD - *Bone morphogenetic protein- Sons of Mothers Against Decapentaplegic*  
CREB-H - *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein H*  
DMT1 - *Divalent Metal Transporter 1*  
DNA – *Deoxyribonucleic acid*  
DRC – Doença Renal Crônica  
EGF – *Epithelial Growth Factor*  
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
ERE – *Estrogen Response Element*  
FPN – *Ferroportin*  
ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*  
GDF15 – *Growth Differentiation Factor 15*  
HAMP - *Hepcidin Antimicrobial Peptide*  
HFE – *Human Hemochromatosis*  
HGF – *Hepatic Growth Factor*  
HIF – *Hypoxia-Inducible Factor*  
HJV - *Hemojuvelin*  
HO-1 – *Heme oxygenase 1*  
HREs – *Hypoxia-Responsive Elements*  
IL-6 – *Interleukin 6*  
IMP – *Integrin-Mobilferrin-Paraferitin*  
IRIDA – *Iron-refractory Iron-deficiency Anemia*  
ISE – Índice de Sedimentação Eritrocitário  
JAK – *Janus kinase*  
JAK-STAT3 – *Janus kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription 3*  
LEAP-1 – *Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 1*  
LIP - *Labile Iron Pool*  
LC-MS - *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*

MALDI-TOMS

- *Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*

mRNA – *Messenger Ribonucleic Acid*

MT2 – *Matriptase-2*

mTOR - *mammalian Target of Rapamycin*

NADPH - *Nicotinamide Adenide Dinucleotide Phosphate*

NTBI – *Non-transfer Bound Iron*

PCR – *Proteína C-Reativa*

PCFT/HCP1 - *Proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1*

PDGF-BB - *Platelet-derived Growth Factor with two BB chains*

PHD – *Prolyl Dehydrogenase*

RIA – *Radio-Immunoassay*

RNA - *Ribonucleic Acid*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SELDI-TOF MS – *Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*

sHJV – *soluble Hemojuvelin*

SiRNA – *Small interference Ribonucleic Acid*

SMAD – *Small body size/Mothers Against Decapentaplegic*

SMAD4 - *Small body size/Mothers Against Decapentaplegic 4*

SMAD1/5/8 - *Small body size/Mothers Against Decapentaplegic 1/5/8*

STAT3 - *Signal transducer and activator of transcription 3*

STEAP - *Six-Transmembrane Epitelial Antigen of the Prostate*

STEAP3 - *Six-Transmembrane Epitelial Antigen of the Prostate 3*

TfR1 – *Transferrin receptor 1*

TfR2 – *Transferrin receptor 2*

TGF- $\beta$  - *Transforming Growth Factor beta*

TNF- $\alpha$  – *Tumor Necrosis Factor alpha*

TWGS1 – *Twisted Gastrulation Protein Homolog 1*

Tmprss6 – *Transmembrane Protease Serine 6*

VHL - *von Hippel-Lindau*

WCX-TOF MS – *Weak Cation Exchange Time-of-Flight Mass Spectrometry*

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	2
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>A IMPORTÂNCIA DO FERRO NOS SERES VIVOS</b>	4
<b>REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO</b>	4
<b>HEPCIDINA</b>	7
Homeostasia do Ferro	8
Estímulo Inflamatório	9
Ambiente Hipóxico	10
Estímulo Eritróide	11
Fatores de Crescimento	12
Estímulo Hormonal	12
Outros Estímulos	13
<b>MÉTODOS DE DOSEAMENTO DA HEPCLIDINA</b>	14
Métodos Imunoquímicos	14
Métodos de Espetrometria de Massa	14
<b>HEPCIDINA COMO BIOMARCADOR DE DOENÇA</b>	
Patologias Hematológicas	15
Patologias Neoplásicas	17
Doença Cardíaca Isquémica	17
Doença Renal Crônica	18
Inflamação e Sépsis	19
Obesidade e Exercício Físico	19
Resistência à Insulina	20
Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono	20
<b>POTENCIAL TERAPÊUTICO DA MODULAÇÃO DA HEPCLIDINA</b>	21
Agonistas	21
Classe 1 – Mimetização da hepcidina	22
Classe 2 – Estimulação da síntese de hepcidina	22
Antagonistas	23
Classe 1 – Supressão da produção de hepcidina	23
Classe 2 – Neutralização da hepcidina	24
Classe 3 – Interferência com a ligação hepcidina-ferroportina	26
<b>CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS</b>	27
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	28

## RESUMO

O ferro é essencial em múltiplas reações na maioria dos seres vivos, mas em excesso pode ser nefasto. A sua biodisponibilidade tem de ser regulada e este controlo é mediado pela hepcidina. Este péptido, inicialmente descrito com um agente antimicrobiano, tem como ação principal inibir a ferroportina, o único exportador de ferro conhecido. Produzida maioritariamente pelo fígado, a hepcidina atua nos enterócitos, macrófagos do sistema reticuloendotelial e hepatócitos, as principais fontes do ferro do organismo.

A produção da hepcidina é estimulada principalmente pelo ferro (via molecular BMP-SMAD) e pelo ambiente inflamatório (via molecular JAK-STAT3) e, inibida pela hipoxia e pelo fator eritroide. Existem outros estímulos secundários que podem influenciar a síntese de hepcidina.

Existem vários métodos de identificação da concentração de hepcidina sérica e urinária. O elevado custo e a disponibilidade limitada condicionam a sua utilização corrente na prática clínica.

Devido ao seu papel e ao estímulo da sua produção, a hepcidina tem vindo a ser considerada um biomarcador em múltiplas patologias, onde o doseamento dos seus níveis contribui para o esclarecimento da patogénese e do prognóstico associados.

Pela sua relevância fisiopatológica, a modulação dos seus níveis afigura-se como uma potencial arma terapêutica com possível impacto significativo como tratamento principal e suplementar de inúmeras patologias.

Os objetivos deste trabalho são abordar o impacto do ferro ao nível da imunidade e a regulação do seu metabolismo; rever as dimensões histórica e fisiológica da hepcidina; descrever os estímulos associados à regulação da hepcidina; analisar os métodos de determinação da hepcidina; abordar a hepcidina como biomarcador de patologias e avaliar as terapêuticas moduladoras da ação da hepcidina existentes atualmente.

A pesquisa de artigos científicos foi efetuada com recurso às bases de dados PubMed e Clinical Key. A bibliografia selecionada sobre o tema incide principalmente nas publicações da última década.

**PALAVRAS-CHAVE:** “hepcidin”, “iron metabolism”, “ferroportin”, “chronic disease”, “anemia”, “inflammation”, “erythropoiesis”.

## ABSTRACT

Iron is essential for multiple reactions in most living organisms, but, in excess, it can become dangerous. Its bioavailability needs to be regulated, which control is mediated by hepcidin. This peptide, initially described as an antimicrobial agent, has, as main function, the ability to inhibit ferroportin, the only exporter of iron known. Synthesised mainly by the liver, hepcidin acts on the enterocytes, macrophages of the reticuloendothelial system and hepatocytes, the main sources of iron in the human body.

The production of hepcidin is stimulated mainly by iron (molecular pathway BMP-SMAD) and by inflammatory environment (molecular pathway JAK-STAT3) and, is inhibited by hypoxia and erythropoiesis. There are other secondary stimuli that can influence the hepcidin production.

Serum and urinary hepcidin levels can be measured by several methods. However, the high cost and limited availability affect their use in clinical practice.

Hepcidin has become known as a biomarker of numerous pathologies, in which the quantification of its levels can contribute for a better understanding of its pathogenesis and prognosis. Due to its physiopathology importance, the modulation of its levels becomes a potential therapeutic weapon with expected significant impact as main and additional treatments of many diseases.

This work aims to address the impact of iron on immunity and the regulation of its metabolism, review the historical and physiological dimensions of hepcidin and the stimuli involved in its regulation, the methods used for detection and quantification of hepcidin and its role as a biomarker of disease. The main known therapies responsible to modulate the action of hepcidin are described according to the state of art.

This study is based on the research of scientific papers in PubMed and Clinical Key databases, published mainly during the last decade.

**KEYWORDS:** “hepcidin”, “iron metabolism”, “ferroportin”, “chronic disease”, “anemia”, “inflammation”, “erythropoiesis”.

## A IMPORTÂNCIA DE FERRO NOS SERES VIVOS

Com raras exceções, virtualmente todos os organismos estudados desde *Archea* até ao Homem são dependentes de ferro para a sua sobrevivência(1). É um componente essencial para múltiplas reações vitais. Trata-se de um metal que existe nas formas reduzida (ferroso –  $\text{Fe}^{2+}$ ) e oxidada (férrica –  $\text{Fe}^{3+}$ ). Dado que esta última mais estável, o transporte transmembranar do ferro, a síntese do heme e a sua libertação a partir da transferrina implicam a existência de reações de redução. Não obstante, estas reações podem conduzir à formação de radicais de oxigénio, com potencial dano celular (1,2), pelo que os níveis de ferro devem ser mantidos sob controlo estrito. O ferro é igualmente fundamental para a proliferação bacteriana, pelo que, nestas condições, a sua disponibilidade também deve ser limitada.

## REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO

Um indivíduo adulto apresenta uma quantidade média de ferro entre 3 e 5 g, armazenado sob a forma de hemoglobina nos eritrócitos (60-70%), ou de hemossiderina e ferritina ao nível dos hepatócitos e macrófagos do sistema reticuloendotelial (20-30%). A mioglobina representa uma porção residual deste metal.

A principal fonte de ferro do ser humano é obtida através da reciclagem de eritrócitos senescentes pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial ou células de *Kupffer*, que permite obter uma quantidade 10 a 20 vezes superior à quantidade de ferro absorvido por via intestinal. Por outro lado, a maior capacidade de regulação da atividade dos macrófagos em comparação com a dos enterócitos garante uma maior eficácia neste processo(3).

Proveniente da hemoglobina, o grupo heme é degradado pela *Heme oxygenase 1* (HO-1), com consequente libertação do ferro. Este é transportado a partir do citoplasma macrofágico para o plasma sanguíneo através da ferroportina, por um processo semelhante ao ferro heme absorvido por via intestinal, que será descrito em seguida(4,5).



É através da ingestão alimentar que se obtém o restante ferro necessário ao organismo. O ferro ingerido, cujo valor diário recomendado é 8-10 mg, encontra-se sob duas formas: ferro inorgânico ou não-heme e ferro heme. O ferro inorgânico está presente, globalmente, sob a forma oxidada em 90% dos alimentos(6). O ferro heme, embora em menor quantidade, apresenta uma absorção mais eficaz(7). Dado que grande parte do ferro é absorvido sob a forma ferrosa, ele é reduzido pela ferriredutase, localizada ao nível das vilosidades intestinais, cujo dador de eletrões é o ácido ascórbico(8). Outros tipos de redutases também foram descritas, tais como os membros do *six-transmembrane epithelial antigen of the prostate* (STEAP), cuja ação não está totalmente esclarecida(9). Uma vez reduzido, o ferro ferroso é absorvido pelos enterócitos duodenais e jejunais proximais pelo transportador nas membranas apicais *Divalent Metal Transporter 1* (DMT1). Este também é responsável pela integração intracelular de outros metais divalentes, como zinco, manganésio e cobre(1).

Por outro lado, a absorção do ferro oxidado é feita em menor quantidade através da via *Integrin-Mobilferrin-Paraferritin* (IMP)(10), que é exclusiva para o ferro férrico. Esta via envolve múltiplas proteínas, as quais constituem um complexo denominado por paraferritina. Entre as moléculas constituintes, a flavina monooxygenase tem um papel equivalente à ferriredutase. Deste modo, após a sua entrada na célula, o ferro é convertido na sua forma ferrosa pela ação da paraferritina com o uso de *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH), o que permite a sua posterior incorporação na biossíntese do heme, através da enzima ferroquelatase(11).

Por último, o ferro heme é absorvido principalmente ao nível do duodeno através dos enterócitos pela *Proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1* (PCFT/HCP1)(12,13). No enterócito, o ferro é transportado para o retículo endoplasmático, onde é incluído nas hemoproteínas, e para o núcleo, onde participa no controlo transcricional de alguns genes(14). Semelhante ao processo no interior das células de Kupffer, o ferro é libertado do anel de protoporfirina, pela ação da HO-1.

No interior dos enterócitos, o ferro pode ser oxidado e sequestrado pela ferritina ou atravessar a membrana basolateral e, posteriormente, ser oxidado e transferido para a transferrina. Após dois dias de função, os enterócitos intestinais descamam, com consequente perda de ferro acumulado sob a forma de ferritina. De modo a contrabalançar esta perda, é possível que o ferro seja transportado para o citoplasma através do *Transferrin receptor 1* (TfR1), embora este mecanismo pareça ser pouco significativo. A transição do ferro desde a região apical até à região basolateral do enterócito poderá ser realizada por transcitose ou associado a proteínas como os *chaperones*, embora o processo não esteja totalmente esclarecido(15). A

passagem a partir da membrana basolateral para o plasma sanguíneo é realizado através da ferroportina, a qual também está presente nos hepatócitos e células placentares(16). O transporte do ferro a nível plasmático necessita novamente da conversão do ferro para a forma férrica, a qual é realizada pela hefaestina a nível duodenal e ceruloplasmina nas restantes localizações(17,18).

No plasma, o ferro é transportado principalmente pela transferrina, a qual tem dois locais de ligação, que permite o transporte de 3mg de ferro, o que equivale a um fluxo diário de 20 mg(3). Esta molécula tem uma elevada afinidade para o ferro não-heme a pH fisiológico(19). No caso de existir sobrecarga de ferro e ser excedida a capacidade de transporte da transferrina, é possível detetar a presença de *non-transferrin-bound iron* (NTBI), que representa o ferro plasmático ligado a outros compostos além da transferrina. Dada a sua menor afinidade de ligação, a sua transferência para o hepatócito é facilitada e, consequentemente, pode gerar toxicidade local(20).

A nível tecidual, a incorporação do ferro é realizada através do ciclo da transferrina. Este processo regula a quantidade de ferro intracelular através da modificação da expressão controlada da TfR1 na superfície celular. A ligação da transferrina diférrica a este recetor desencadeia a sua interiorização mediada por vesículas de clatrina e o seu transporte até ao endossoma ácido. Graças à bomba de prótons, o pH baixo provoca alterações conformacionais da transferrina e libertação do ferro(21). O ferro oxidado é reduzido pela *six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3* (STEAP3) antes de ser transportado para fora do endossoma via transportador DMT1(22). Depletada de ferro, a apotransferrina volta à superfície celular e ao plasma sanguíneo, o último passo do ciclo de transferrina. Esta proteína apresenta um período de vida médio de 100-200 ciclos de transporte. Em situações de sobrecarga de ferro com sobressaturação da transferrina, este metal pode transitar intracelularmente, sob a forma de NTBI, através do transportador ZP14, de modo a diminuir o excesso de concentração plasmática de ferro. Este processo ocorre maioritariamente a nível hepático, embora esta molécula também se encontre presente a nível pancreático e cardíaco, o que permite explicar os principais locais de deposição de ferro (23).

A nível intracelular, o ferro entra no *labile iron pool* (LIP), onde se associa a ligandos de baixa afinidade, sendo o mais predominante a *iron(II)-glutathione*(24,25). Este compartimento é responsável pelo ferro para a síntese de heme e do centro de ferro-enxofre, a nível da mitocôndria, e de proteínas compostas por ferro(24). Todavia, ele representa apenas menos de 5% do ferro intracelular. A maioria é acumulada sob a forma de ferritina, de modo a permitir o seu armazenamento e impedir reações potencialmente tóxicas(26). Aquando de défice de

ferro, a ferritina é utilizada, embora o mecanismo de libertação de ferro a partir desta molécula ainda não esteja totalmente compreendido(27). A ferritina é armazenada no citoplasma, maioritariamente. Todavia, também está presente a nível nuclear e mitocondrial, onde poderá ter um papel importante na supressão de reações oxidativas ao nível da síntese do *Deoxyribonucleic acid* (DNA) e do grupo heme, respetivamente(28–30). Quando acumulada em excesso, a ferritina mitocondrial armazena o ferro de forma inativa e inútil para as suas reações (31). Embora seja principalmente intracelular, a ferritina plasmática é proporcional às reservas de ferro existentes, sendo que 1µg/L corresponde a 8-10 mg de ferro armazenado intracelularmente. Esta forma de ferritina, embora possa funcionar como um transportador de ferro, não tem uma função específica conhecida(32).

Em situações patológicas de sobrecarga de ferro, a principal proteína de armazenamento é a hemossiderina, um composto insolúvel resultante da degradação incompleta da ferritina. Em condições fisiológicas, não contribui para a homeostasia do ferro, embora apresente uma função protetora, semelhante à ferritina. No entanto, na presença de hipoxia ou ambiente inflamatório, o meio ácido pode aumentar a libertação de ferro necessário às reações oxidativas, o que contribui para o dano celular e tecidual(33).

Não se conhece nenhuma via de excreção do ferro com exceção de perdas ocasionais por descamação do epitélio cutâneo, células intestinais, secreções intestinais, entre outros, que equivalem a cerca de 1-2 mg por dia. Devido ao cataménio, gravidez e parto, um indivíduo do sexo feminino perde uma quantidade de sangue superior ao sexo masculino durante a idade reprodutiva(6).

## HEPCIDINA

A hepcidina foi inicialmente descrita como o péptido antimicrobiano *Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 1* (LEAP-1), dada a sua atividade antibacteriana e antifúngica (34,35), e só mais tarde foi associada à regulação do metabolismo do ferro(36,37). É codificada pelo gene *Hepcidin Antimicrobial Peptide* (HAMP), localizado no cromossoma 19, e produzida maioritariamente pelo fígado e em menores quantidades pelo coração, rim, retina, células alveolares, monócitos, macrófagos, linfócitos, adipócitos e células β pancreáticas. Nos locais

de síntese extra-hepáticos, parece apresentar ações parácrina e autócrina na regulação da homeostasia do ferro. Contudo, esta função não está totalmente esclarecida(38,39).

A hepcidina começa por ser sintetizada como um pré-pró-péptido de 84 aminoácidos, é clivada duas vezes a nível citoplasmático e secretada sob a forma de um péptido maduro de 25 aminoácidos, através da remoção da região promotora pela pró-hormona convertase furina(40). No plasma, também é possível detetar a hepcidina-22 e a pro-hepcidina, que se pensa não terem atividade biológica, embora possam ter ação bacteriostática(41,42). A hepcidina-25 é excretada a nível renal, juntamente com a hepcidina-20 e hepcidina-22, consideradas produtos de degradação(43). A regulação da sua produção é realizada, principalmente, a nível transcricional(44).

A hepcidina é um regulador negativo do metabolismo do ferro(45). A sua ligação à ferroportina leva à ubiquitinação deste transportador nas principais células responsáveis pela homeostasia do ferro (células de *Kupffer*, hepatócitos e enterócitos), com consequente endocitose e degradação deste complexo(45,46). A diminuição da expressão deste recetor ao nível da superfície celular impede a transposição do ferro entre os meios intracelular e extracelular, o que conduz à sua retenção a nível intracelular, com diminuição da saturação de transferrina e da biodisponibilidade do ferro(45). Os principais reguladores da síntese da hepcidina estão ilustrados na figura 1.

## Homeostasia do Ferro

A via molecular mais estudada é a *Bone Morphogenetic Protein-Small body size/Mothers Against Decapentaplegic* (BMP-SMAD)(47). Esta inicia-se ao nível da superfície do hepatócito através das proteínas *Human Hemochromatosis* (HFE), *Bone Morphogenetic Protein Receptor I e II* (BMPRI e BMPRII) e *Hemojuvelin* (HJV)(48). Dentro desta via(49), a molécula mais importante é o *Bone Morphogenetic Protein 6* (BMP6)(50), cujos níveis se correlacionam com a concentração intracelular hepática de ferro. Este liga-se à junção proteica BMPR-HJV, que, por conseguinte, irá ativar a fosforilação do complexo SMAD1/5/8. Através da interação com SMAD4, o complexo é translocado para o núcleo e ativa a síntese da hepcidina(48). Como referido anteriormente, o início desta via necessita da HJV como correceptor(49), para permitir a ligação do BMP ao BMPR-I e BMPR-II. Na deficiência de ferro, ocorre a regulação pós-transcricional da proteína *Matriptase-2* (MT2), codificada pelo gene *Transmembrane Protease Serine 6* (Tmprss6), responsável pela clivagem da HJV(48). Desta forma, é inibida

a ativação dos recetores BMPR pelas proteínas BMP e, consequentemente, a transcrição do gene HAMP, o qual codifica a hepcidina(51).

Outra via molecular responsável pela modulação da transcrição da hepcidina está associada ao complexo proteico HFE, *Transferrin Receptor 1* (TfR1) e *Transferrin Receptor 2* (TfR2). Este tem a capacidade de deteção aguda dos níveis plasmáticos de transferrina saturada, uma vez que a HFE compete com o local de ligação da transferrina saturada à TfR1(52). Por outro lado, outras vias moleculares associadas à alteração crónica dos níveis corporais de ferro também foram propostas (53).

## Estímulo Inflamatório

A inflamação ou infeção conduzem ao aumento de diferentes citocinas, entre as quais a *Interleukin 6* (IL-6), a principal responsável pela síntese da hepcidina (54). A ligação da IL-6 ao seu recetor, na superfície do hepatócito, induz a fosforilação da *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) por intermédio da proteína *Janus kinase* (JAK)(55,56) e a sua translocação para o núcleo, onde se liga ao promotor do gene HAMP(57), e promove a transcrição deste gene e à síntese de hepcidina. O objetivo final é a limitação do ferro disponível para os agentes infecciosos(54).

Apesar de estímulos iniciais distintos, estudos sugerem que as vias BMP-SMAD e *Janus kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (JAK-STAT3) não são vias moleculares independentes, dada a necessidade de componentes de uma via para permitir o funcionamento da outra. Tome-se como exemplo a ausência de SMAD4 que impede a transcrição do gene HAMP, quando estimulado com IL-6(58), e a diminuição da síntese de hepcidina pela IL-6, aquando da utilização de um inibidor do BMPR tipo I(59). Um dos possíveis componentes moleculares responsáveis pela comunicação é a *activin B*, membro da superfamília *Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ ), dado o aumento do seu *messenger ribonucleic acid* (mRNA) comparativamente aos membros da família BMP, aquando da fosforilação do SMAD1/5/8 associado à presença de lipopolissacarídeos(60). No entanto, o seu papel não está totalmente esclarecido. Por outro lado, outros estudos sugerem interações entre a via responsável pela deteção dos níveis de ferro plasmático e a via molecular JAK-STAT3. Embora inicialmente tenha sido estabelecida a necessidade de HFE para a ativação da via molecular associada à inflamação(61), posteriormente foi refutada esta hipótese(62). Portanto, mesmo na ausência de TfR2 e HFE, a hepcidina é sintetizada em resposta à

inflamação. Contudo, este processo é insuficiente para permitir uma redução eficaz do ferro sérico(63).

## Ambiente Hipóxico

Na presença de anemia ou hipoxia, a produção de eritropoietina aumenta para compensar a diminuição de oxigénio fornecido aos tecidos. Para aumentar o ferro disponível para a eritropoiese, a secreção de hepcidina é inibida, o que permite a expressão da ferroportina a nível das membranas celulares macrofágica, hepática e enterocítica e, consequentemente, o aumento do ferro plasmático(64). Os fatores responsáveis pela ativação desta via de regulação, ao nível da medula óssea, ainda não estão totalmente esclarecidos(65).

A resposta celular adequada às alterações de concentração de oxigénio em processos fisiológicos ou patológicos é mediada pelo fator de transcrição *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF), cujas subunidades são HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  e HIF3 $\alpha$ . Em normóxia, o HIF $\alpha$  é hidroxilado pela *Prolyl Dehydrogenase* (PHD), o que permite a sua ubiquitinação pelo fator *von Hippel-Lindau* (VHL) e degradação pelo proteossoma 26S. Todavia, perante um ambiente hipóxico, a inativação do HIF $\alpha$  não ocorre. Este liga-se ao HIF $\beta$  nuclear, que permite a formação de um heterodímero, o qual se liga à região do promotor dos genes dos *Hypoxia-Responsive Elements* (HREs) e garante a transcrição dos genes associados à hipoxia. Um destes é responsável pela síntese de eritropoietina(66).

Deste modo, foi estabelecida a relação entre o aumento dos níveis de HIF1 $\alpha$  e o défice de ferro(67). Por outro lado, o HIF2 $\alpha$  também é necessário para a absorção de ferro, uma vez que regula diretamente a transcrição do gene responsável pela formação de DMT1, o principal transportador apical intestinal de ferro(68).

Como um dos principais reguladores do ferro corporal disponível, a hepcidina também apresenta relação com o estímulo hipóxico. Uma das enzimas associadas é a furina, cujos níveis de mRNA estão diretamente relacionados com o HIF1 $\alpha$ . Esta protease é responsável pela clivagem de HJV no retículo endoplasmático e libertação da sua forma solúvel (sHJV) para o plasma, a qual compete com a HJV membranar como ligando da BMP(69,70). Por outro lado, a enzima MT2, expressa principalmente a nível hepático e regulada pelo HIF1 $\alpha$ (71), também apresenta ação contra a HJV membranar, já que promove a sua clivagem. Ambas estas proteínas inibem a via molecular BMP-SMAD e poderão representar uma ação biológica indireta do HIF1 $\alpha$ (72). Em contrapartida, o HIF2 $\alpha$  não é necessário à inibição da

síntese de hepcidina, embora a concentração de hepcidina hepática seja inferior quando o HIF2 $\alpha$  se encontra ativo. A relação desta subunidade com a transcrição do gene *Tmprss6* e a protease furina é controversa.

Outra via molecular possivelmente relacionada com o ambiente hipóxico está associada à *Platelet-derived Growth Factor with two BB chains* (PDGF-BB), cuja ativação está dependente de múltiplas cascatas de sinalização, entre as quais a *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein H* (CREB-H). Esta via também está possivelmente associada à síntese de hepcidina mediada pelo *stress* ao nível do retículo endoplasmático(73).

Por outro lado, o fator de transcrição *Atonal Homologue 8* (ATOH8) poderá atuar diretamente por ligação ao promotor do gene HAMP ou, indiretamente, através da promoção da fosforilação do SMAD1/5/8 e ativação da restante via molecular BMP-SMAD(74).

Por fim, o HIF1 $\alpha$  apresenta atividade direta sobre o promotor do gene HAMP, dado que inibe a sua transcrição(67). Por outro lado, em ambiente hipóxico, ocorre diminuição dos níveis de mRNA de TfR2, que reduz a atividade da via molecular associada e a síntese de hepcidina(75).

Em suma, existem múltiplas potenciais moléculas e vias moleculares responsáveis pela regulação da síntese de hepcidina em ambiente hipóxico. Não obstante, a ação destes poderá ser diretamente associada à hipóxia, indiretamente associada ao estímulo eritropoiético ou existir uma relação entre estes. São necessários mais estudos para esclarecer este facto.

## Estímulo Eritróide

A eritropoiese é o processo fisiológico responsável pela síntese dos eritrócitos, localizado ao nível da medula óssea. O seu principal estímulo é a eritropoietina, produzida, na sua maioria, a nível renal e responsável pelas fases finais de maturação dos eritroblastos. Quando a eritropoiese é funcional, o aumento desta glicoproteína conduz rapidamente à diminuição da hepcidina sérica, que garante o fornecimento adequado de ferro e evita o desenvolvimento de anemia perante processos hemorrágicos ou hemolíticos(76,77). Todavia, a regulação pela eritropoietina é realizada de forma indireta(78). As primeiras moléculas sugeridas para o controlo eritroide foram *Growth Differentiation Factor 15* (GDF15) e *Twisted Gastrulation Protein Homolog 1* (TWSG1). A primeira é produzida pelos eritroblastos maduros e atua sob uma via molecular desconhecida(79), enquanto que a segunda é produzida pelos eritroblastos



jovens e atua através da inibição da via BMP-SMAD(80). No entanto, estas moléculas não são suficientes e as únicas a regular a totalidade deste processo(81). Mais recentemente, foi descrita a eritroferrona como o principal fator eritróide. É sintetizada pelos eritroblastos, a partir da tradução do gene *Fam132b*. Foi demonstrada a necessidade deste péptido para ocorrer a regulação negativa da hepcidina durante um episódio hemorrágico, bem como a possível participação deste mediador na fisiopatologia das anemias com sobrecarga de ferro. Todavia, o papel da eritroferrona na supressão da ação da hepcidina e da concentração sérica de ferro, bem como o potencial terapêutico da sua neutralização ainda não estão totalmente esclarecidos(82).

## Fatores de Crescimento

Alguns fatores de crescimento, tais como *Epithelial Growth Factor* (EGF) e *Hepatic Growth Factor* (HGF), associados à regeneração hepática, apresentam capacidade de supressão da regulação transcricional da hepcidina pelo ferro e BMP6, através da diminuição da translocação do complexo SMAD1/5/8 para o núcleo. No entanto, não têm ação sobre a ativação do SMAD1/5/8, os níveis proteicos de SMAD1, SMAD5 ou SMAD4 ou a produção de moléculas inibidoras do SMAD(83).

## Estímulo Hormonal

Um dos principais alvos de estudo a nível da regulação hormonal é a interação entre os estrogénios e o ferro a nível sistémico e, atualmente, a sua ação na regulação da hepcidina. O tratamento com 17 $\beta$ -estradiol permitiu suprimir a transcrição do gene HAMP, através da ligação a um *Estrogen Response Element* (ERE), localizado ao nível do promotor deste gene(84). No entanto, outro estudo verificou um aumento de mRNA de hepcidina após administração *in vitro* de 17 $\beta$ -estradiol(85). Deste modo, a via molecular entre os estrogénios e ferro, bem como o efeito destes na regulação da hepcidina, ainda não estão totalmente esclarecidos. A testosterona apresenta uma ação semelhante, uma vez que inibe a transcrição do gene HAMP, independentemente da presença de EPO(86,87).



## Outros Estímulos

Recentemente, foi verificada uma potencial ligação entre a inibição da síntese de hepcidina e as vias moleculares Ras/RAF *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) e *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR). Estas vias estão associadas à proliferação e crescimento celulares hepatocitários, importantes na resposta à lesão hepática, e estão ativadas, de forma aberrante, no carcinoma hepatocelular. Deste modo, esta relação poderá explicar a diminuição da expressão de hepcidina nestas situações. A importância destes processos na conservação do tecido hepático demonstra o impacto do controlo do ferro, bem como a dimensão destas vias moleculares no controlo da transcrição do gene HAMP. Por essa razão, a utilização de inibidores da mTOR como forma de tratamento do carcinoma hepatocelular poderá estar associada à indução de restrição de ferro a nível tumoral, a partir da ação da hepcidina, para além da supressão da proliferação celular e angiogénese(88).

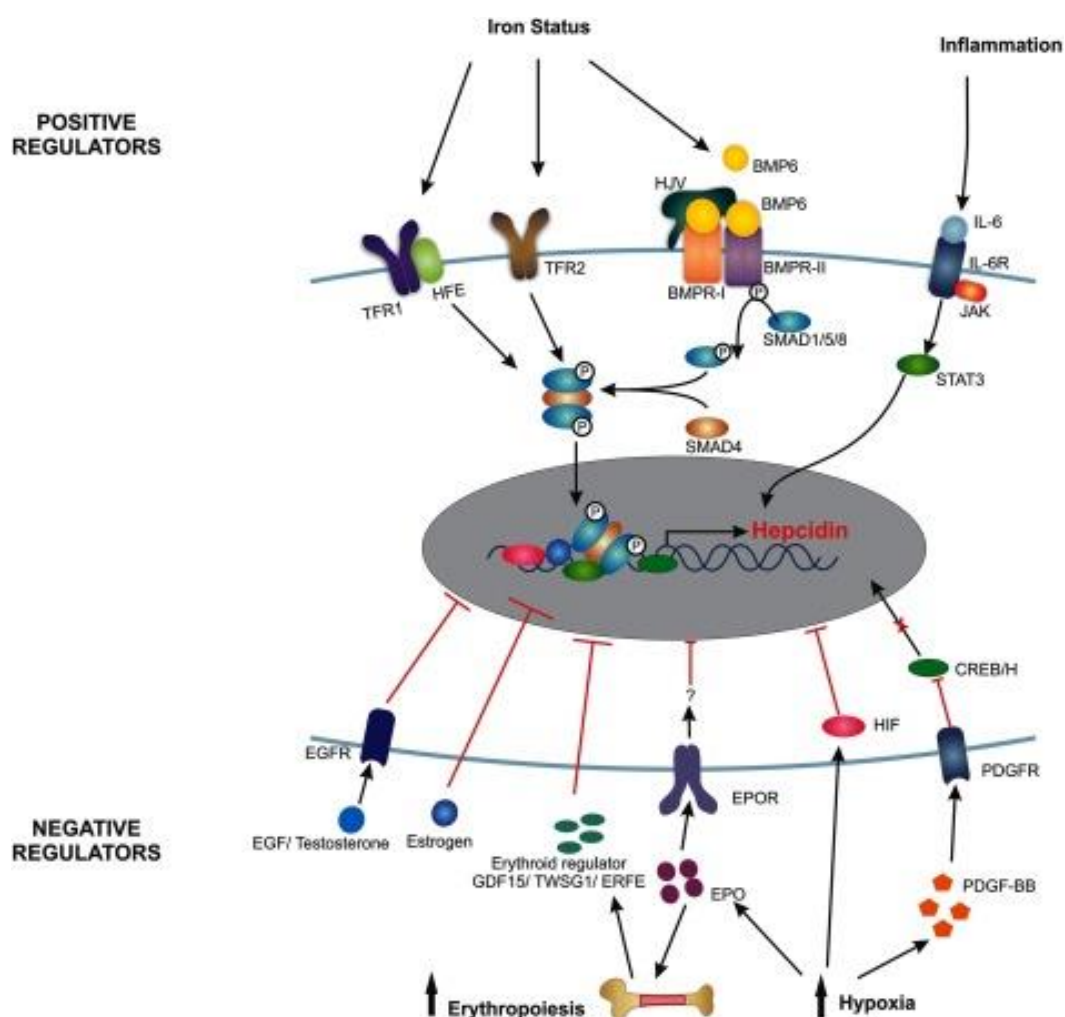


Figura 1: Regulação positiva e negativa da hepcidina (89)

## MÉTODOS DE DOSEAMENTO DA HEPCIDINA

Ao longo do tempo foram desenvolvidos múltiplos métodos de avaliação da concentração de hepcidina. Estes métodos podem ser divididos em dois tipos principais: baseados em espectrometria de massa e em princípios imunoquímicos. Enquanto os primeiros são capazes de diferenciar entre as diferentes isoformas da hepcidina, os segundos apenas conseguem quantificar a hepcidina total. Apesar da multiplicidade de métodos existentes, os resultados obtidos não são globalmente consensuais e ainda não foi desenvolvido o método de referência de doseamento da hepcidina a nível urinário e sanguíneo(89).

### Métodos imunoquímicos

Dada o reduzido tamanho e a estrutura química da forma ativa da hepcidina, os três métodos imunoquímicos atualmente em utilização são *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), na forma competitiva ou *sandwich*, e *Radio-immunoassay* (RIA). Dada a utilização de radioisótopos pelo RIA, os métodos ELISA são globalmente mais aceites(89).

Na RIA, a hepcidina é misturada com um antígeno radioativo e ocorre competição pelo mesmo anticorpo. Esta técnica apresenta alta sensibilidade (0,02 ng/mL). Por outro lado, o método de ELISA apresenta as formas *competitive* e *sandwich*. Na primeira, é utilizada hepcidina biotiniliada como competidor da hepcidina. No entanto, em comparação com outros métodos de doseamento, o uso de um único anticorpo está associado a menor sensibilidade na deteção da hepcidina sintética. Por essa razão, foi desenvolvida a forma *sandwich* (sELISA), que consiste na utilização de dois anticorpos monoclonais independentes específicos para uma isoforma da hepcidina, que garante maior precisão (limite de deteção 0,01 µg/L). Todavia, dados os diferentes princípios laboratoriais utilizados, os resultados obtidos por este método não apresentam elevada fiabilidade(89).

### Métodos de espectrometria de massa

*Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOMS) é um método de avaliação utilizado globalmente na avaliação molecular qualitativa, dada a sua rapidez e facilidade de uso. No entanto, apesar das múltiplas estratégias possíveis, a precisão

dos resultados obtidos é baixa e a sua seletividade restrita, pelo que o seu uso na avaliação quantitativa não é recomendado. Por outro lado, as técnicas de *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC-MS) apresentam elevados níveis de sensibilidade e especificidade, o que permite a quantificação da hepcidina com quase perfeita precisão, desde que o método utilizado tenha sido validado(89).

De modo a complementar as limitações das técnicas de espectrometria de massa molecular, foi desenvolvida a *Inductively coupled plasma mass spectrometry* (ICP-MS), a qual não necessita da utilização de *standards* específicos. Isto permite o cruzamento de dados e conclusões mais corretas entre diferentes estudos(89).

Em suma, dado o elevado conjunto de requisitos necessários, ainda não foi desenvolvido e estabelecido o *gold standard* para a quantificação da hepcidina. A incapacidade de determinar a sua concentração impede a implementação adequada da modulação da sua atividade como medida terapêutica(89).

## HEPCIDINA COMO BIOMARCADOR DE DOENÇA

### Patologias Hematológicas

Em situações patológicas, a expressão de hepcidina pode estar inapropriadamente diminuída ou aumentada. O défice inapropriado de hepcidina circulante está associada ao desenvolvimento de duas principais patologias: hemocromatose hereditária e anemias associadas a sobrecarga de ferro.

A hemocromatose hereditária é uma patologia associada a mutações de genes associados à homeostasia do ferro e, consequentemente, desregulação da ação de hepcidina. A diminuição da sua síntese ou resistência à sua ação biológica condicionam um aumento inapropriado da absorção intestinal de ferro e a sua deposição patológica a nível do parênquima hepático, pancreático e pele. Múltiplos genes estão associados à hemocromatose hereditária, entre os quais HFE, HJV, HAMP, TfR2 e FPN(48). A forma hereditária mais comum está associada ao gene HFE(48), enquanto que a hemocromatose tipo 2 ou juvenil ao gene HJV (tipo 2A) ou

HAMP (tipo 2B), a tipo 3 ao gene TfR2 e o tipo 4 ao gene associado à ferroportina SLC40A1(90).

Por outro lado, nas anemias associadas a sobrecarga de ferro, a absorção intestinal de ferro é permanentemente estimulada, apesar das concentrações elevadas de ferritina, ferro e saturação de transferrina plasmáticos. Deste grupo de patologias, a mais comum é a Talassemia  $\beta$ . Uma das hipóteses propostas é a inibição da via molecular BMP-SMAD por ação de citocinas da família do TGF- $\beta$ , nomeadamente pela GDF15 e pela TWGS1. No entanto, a importância destas citocinas neste processo ainda não está totalmente esclarecida(48).

A hemocromatose hereditária e as anemias com sobrecarga de ferro estão associadas a concentrações elevadas de ferro plasmático e tecidual, as quais promovem o desenvolvimento de espécies reativas de oxigénio. Consequentemente, estas podem ser responsáveis pela promoção de inflamação hepática crónica, que, a longo prazo, pode evoluir para cirrose e carcinoma hepáticos.

No extremo oposto, a *Iron-refractory Iron-deficiency Anemia* (IRIDA) e a anemia de doença crónica estão associadas à sobre-expressão de hepcidina(91). A primeira é uma doença autossómica recessiva associada à inativação da enzima MT2, responsável pela clivagem da proteína HJV, e estimulação sustentada da via associada(48). Por outro lado, a segunda, uma patologia multifatorial, está associada a inúmeras patologias, as quais, progressivamente, desenvolvem um ambiente inflamatório, o qual é um dos mecanismos responsáveis pela regulação da hepcidina(92). Deste modo, a inflamação está associada à diminuição da resposta à eritropoietina, diminuição do período de sobrevida dos eritrócitos maduros e da biodisponibilidade de ferro(93).

Por último, a síntese inapropriada de hepcidina pode ser causada por adenomas benignos hepáticos produtores de hepcidina, em doentes com doença de armazenamento do glicogénio tipo 1A, associada ao défice de glucose-6-fosfatase. Trata-se de uma etiologia rara e apresenta níveis séricos de ferritina normais associados a anemia microcítica hipocrómica. Geralmente, ocorre regressão do quadro após remoção dos adenomas(92).

## Patologias Neoplásicas

Múltiplas neoplasias hematológicas (leucemia, linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, mieloma múltiplo) e tumores sólidos (mama, rim, cérebro, ovário, pulmão, entre outros) estão associados ao desenvolvimento de anemia resultante da expressão excessiva de hepcidina(43).

Independentemente do grau de diferenciação, de modo a promover a sua proliferação e crescimento, o tecido tumoral apresenta diversas funções fisiológicas modificadas. Para além do ambiente inflamatório descrito anteriormente, outros mecanismos independentes desta via estão descritos em neoplasias hematológicas, tal como o aumento de BMP2 e alterações ao nível de TfR1 e TfR2(94).

Em relação aos tumores sólidos, tome-se como exemplo o carcinoma de células renais e o carcinoma da mama. Os níveis de hepcidina plasmáticos não apresentam relação com o nível de diferenciação celular e estadio tumoral. No entanto, a expressão de mRNA de hepcidina correlaciona-se com o potencial metastático, o que o torna um potencial marcador de prognóstico para esta patologia(95). Por outro lado, no carcinoma da mama, a hepcidina poderá ser utilizada como método de diagnóstico precoce desta patologia(96).

Relativamente à terapêutica implementada, em doentes com cancro da mama submetidos a quimioterapia, a avaliação seriada da concentração sérica de hepcidina associada à hemoglobina poderá permitir prever o desenvolvimento de anemia(97). A radioterapia pode estimular a síntese de citocinas inflamatórias e promover o aumento da expressão de hepcidina. Apesar de ambas as formas de tratamento poderem contribuir para o agravamento da anemia(98), a restrição da absorção intestinal e utilização celular de ferro diminui a sua disponibilidade para o desenvolvimento tumoral, pelo que potencia o efeito antineoplásico destas terapêuticas(99).

## Doença Cardíaca Isquémica

A doença cardíaca isquémica é uma das doenças mais prevalentes no mundo ocidental, com aumento registado de incidência anual associado à adoção de estilos de vida inadequados. Por essa razão, é importante conhecer os mecanismos associados a esta patologia, de modo a desenvolver armas terapêuticas adequadas no seu combate.

A doença cardíaca isquémica está associada à aterosclerose, uma das formas de arteriosclerose. Esta é uma condição patológica, onde ocorre o desenvolvimento de uma placa, constituída por colesterol, ácidos gordos, cálcio, fibrina, entre outros, no interior das artérias, com diminuição da sua flexibilidade e aumento da sua rigidez. No interior das lesões ateroscleróticas, o ferro encontra-se em concentrações superiores à normalidade(100). A sua presença poderá estar associada a disfunção endotelial e aterosclerose, através da formação de radicais livres e *stress* oxidativo(101). Assim, o controlo do ferro disponível para a progressão das lesões ateroscleróticas poderia diminuir o seu desenvolvimento e a incidência da doença cardíaca isquémica, embora os múltiplos estudos epidemiológicos apresentem resultados conflituosos(101–103). Por outro lado, a prevenção da mobilização de ferro a partir dos macrófagos para as placas ateroscleróticas promove o aumento da concentração celular deste metal, a estimulação da peroxidação lipídica e a progressão para *foam cells*(104).

Nos doentes com hemocromatose hereditária, poder-se-ia pensar que a deposição do ferro aumentada em diversos tecidos iria gerar um efeito exponencial no potencial oxidativo deste metal, nomeadamente a nível cardíaco. Todavia, em comparação com a população geral, a prevalência de coronariopatia, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica não se encontra aumentada e, com base em estudos epidemiológicos e *post-mortem*, a probabilidade de ocorrência deste tipo de eventos encontra-se até diminuída(103,105,106).

## Doença Renal Crónica

A doença renal crónica (DRC) é uma das patologias com maior prevalência a nível mundial e de incidência crescente. Dado que o rim é o principal local responsável pela produção de eritropoietina, a anemia é comum e associa-se a menor qualidade de vida e maior risco de eventos adversos como patologias cardiovasculares. Apesar da anemia ser controlada com o uso de agentes estimuladores da eritropoiese (AEE) e ferro intravenoso, o número de eventos cardiovasculares mantém-se elevado. A hepcidina apresenta uma relação diretamente proporcional com o desenvolvimento e severidade da anemia e a sua concentração aumenta de forma significativa com a progressão da DRC, dada a progressão do ambiente inflamatório associado à síndrome urémica. Através do controlo da hepcidina, poderia ser possível reduzir a dose de ferro administrado e, consequentemente, melhorar a eficácia dos AEE e diminuir os seus efeitos adversos. Nos doentes dialisados, foi demonstrada uma correlação direta entre as concentrações de hepcidina e ferritina séricas e uma correlação inversa entre os níveis séricos de hepcidina e a resposta aos ESA(107). Assim, a hepcidina poderá ser um

biomarcador viável para avaliar as necessidades biológicas de ferro e a resposta aos AEE na DRC e eventuais eventos adversos.

## **Inflamação e Sépsis**

A inflamação é um mecanismo de defesa em resposta à infecção, tecidos transplantados e células tumorais, mas também está associada a outras condições, como aterosclerose, autoimunidade e reações alérgicas. Como discutido anteriormente, um dos fatores positivos de regulação da hepcidina é a inflamação. Dado que os níveis plasmáticos de hepcidina são modulados ao longo do desenvolvimento e tratamento de infecção aguda(108), este péptido é um potencial marcador de fase aguda como a proteína c reativa (PCR), a procalcitonina e o índice de sedimentação eritrocitário (ISE). Em patologias específicas, como a pancreatite aguda, a valor da hepcidina é considerado superior à PCR(109).

A sépsis representa um desafio diagnóstico em medicina, em particular nos recém-nascidos, nos quais a obtenção de amostra de sangue para hemoculturas é particularmente difícil. A quantificação dos marcadores de fase aguda ajuda no diagnóstico desta síndrome e a hepcidina poderá ser um biomarcador muito útil nesta faixa etária(110). A transposição destes resultados para as demais faixas etárias poderá permitir a identificação do quadro séptico de forma mais eficiente e a implementação de terapêutica adequada mais precocemente.

## **Obesidade e Exercício Físico**

O tecido adiposo é um órgão endócrino responsável pela produção de vários péptidos biologicamente ativos, nos quais se inclui a hepcidina. A obesidade severa está associada a um aumento crónico de produção de adipocitoquinas pró-inflamatórias, as quais geram um ambiente inflamatório de baixo grau constante. Este estímulo promove uma síntese aumentada de hepcidina nestes indivíduos. Por essa razão, a população obesa apresenta, mais frequentemente, défice de ferro em comparação com os indivíduos de peso adequado(111).

Por outro lado, o exercício físico severo pode estar associado ao aumento da hepcidina plasmática e consequente diminuição de ferro. Todavia, os estudos realizados não permitem

quantificar o grau e a duração do exercício físico necessários para iniciar o processo inflamatório e a síntese da hepcidina(112,113).

## Resistência à Insulina

A resistência à insulina é observada em múltiplas patologias, nomeadamente na diabetes *mellitus* tipo 2 e na síndrome do ovário poliquístico. A relação entre a hepcidina e a insulina pode estar associada a múltiplos processos. Por um lado, a insulina estimula a síntese de hepcidina através da via molecular JAK-STAT3. Por outro lado, dado que as células  $\beta$  pancreáticas são uma das fontes extra-hepáticas de hepcidina, a presença de glicose estimula a síntese de insulina e, consequentemente, a produção de hepcidina. Desta forma, os níveis de hepcidina estarão diminuídos em ambas as patologias, o que propicia um estado metabólico de sobrecarga de ferro. Não obstante, a associação entre a hepcidina e resistência à insulina ainda não está totalmente esclarecida(114).

## Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono

Esta síndrome é caracterizada pela obstrução da via aérea superior parcial ou total associado a períodos de apneia intermitente durante o sono e desenvolvimento de hipoxia ocasional. Esta patologia está associada a dois estímulos opostos. Por um lado, o aumento da produção de citocinas, como a PCR, IL-6 e *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), gera um ambiente inflamatório. Por outro lado, os episódios de hipoxia são um fator negativo na regulação da síntese de hepcidina, como referido anteriormente. Dada a importância do número e duração dos episódios de hipoxia, a hepcidina poderá ser potencialmente utilizada como um marcador de prognóstico nesta patologia, embora sejam necessários mais estudos nesta área(115).



## POTENCIAL TERAPÊUTICO DA MODULAÇÃO DA HEPCIDINA

Como abordado anteriormente, a hepcidina tem um papel ativo na fisiopatologia de inúmeras doenças associadas à desregulação do ferro. O desenvolvimento de fármacos que promovam ou inibam a sua ação poderá ter impacto na história natural destas patologias. Os agonistas da hepcidina podem mimetizar a sua ação (classe 1) ou estimular a sua produção (classe 2). Por outro lado, os antagonistas podem inibir a sua produção (classe 1), neutraliza-la (classe 2) ou interferir com a sua ligação à ferroportina (classe 3). As múltiplas classes estão sintetizadas na tabela 1.

**Tabela 1** – Classificação dos agentes responsáveis pela modulação da ação da hepcidina (adaptado de (116) )

Ação terapêutica	Alvo terapêutico	Modo de ação	Agentes
<b>Agonistas</b>	Sobrecarga de ferro	Mimetização da hepcidina	Mini-hepcidina
		Estimulação da produção da hepcidina	Silenciadores do gene Tmprss6 Administração de BMP6 Genisteína
<b>Antagonistas</b>	Anemias associadas a défice de ferro	Supressão da produção de hepcidina	Inibidores da via molecular BMP e JAK-STAT3 Agentes estimuladores da eritropoiese Antagonistas IL-6 e anti-TNF $\alpha$ siRNA e ASO
		Neutralização da hepcidina	Anticorpos anti-hepcidina Anticalinas <i>Spielgermer</i>
		Interferência com a ligação hepcidina-ferroportina	Anticorpos anti-ferroportina Modificadores Tiol

### Agonistas

Este tipo de fármacos seriam particularmente importantes no tratamento da hemocromatose hereditária e das anemias associadas a sobrecarga de ferro, situações onde as armas terapêuticas disponíveis são muito limitadas e nem sempre toleradas(116). Atualmente, a

síntese de hepcidina inalterada é difícil e onerosa e a sua semivida bastante curta. Por essa razão, é importante a promoção do desenvolvimento destas terapêuticas.

### Classe 1 – Mimetização da hepcidina

As mini-hepcidinas foram criadas com base na região responsável pela ligação da hepcidina à ferroportina(117). A sua estrutura é composta pelos nove primeiros aminoácidos da terminação N da hepcidina, responsáveis pela sua atividade biológica; péptidos sintéticos com terminação N, que aumentam a sua biodisponibilidade; diferentes aminoácidos da sua composição inicial, que aumentam a resistência à proteólise; e ácidos gordos, os quais aumentam a sua semivida molecular e poderão aumentar a sua absorção oral(117). Algumas das moléculas desenvolvidas apresentam uma atividade biológica pelo menos semelhante à hepcidina inalterada e com um tempo de semivida superior. As mini-hepcidinas têm maior eficácia na prevenção da sobrecarga de ferro, através da diminuição da sua concentração a nível hepático, cardíaco, duodenal e esplénico. Estas poderão ser utilizadas em combinação com flebotomia ou quelantes de ferro(118). Atualmente, encontram-se em desenvolvimento pré-clínico(119).

### Classe 2 – Estimulação da síntese de hepcidina

A síntese de hepcidina é estimulada por diversas vias moleculares. Destas, os dois principais alvos moleculares estudados com possível impacto terapêutico são o MT2 e o BMP6. O primeiro é um regulador negativo da produção de hepcidina(120), o qual, se inibido, permite aumentar os níveis de ferro sérico, melhorar o estado global de deficiência do mesmo e, consequentemente, melhorar a eritropoiese. Por essa razão, foi estudada o possível uso de *anti-sense oligonucleotide* (ASO) e *small interference RNA* (siRNA)(121,122), os quais, apesar de terem mecanismo de ação distintos, promovem o aumento da expressão de mRNA da hepcidina. Por essa razão, o uso do MT2 como alvo terapêutico poderá ser promissor. Atualmente, encontra-se em desenvolvimento o inibidor ALN-TMP para uso clínico(123).

Na família de moléculas BMP, a BMP6 é uma das principais responsáveis pela transcrição do péptido hepcidina, pelo que o desenvolvimento de agonistas desta molécula poderá aumentar a concentração de hepcidina, embora nem todos os estudos tenham demonstrado uma melhoria significativa na retenção de ferro tecidual(124,125). Como a ação do grupo de

moléculas BMP não se limita à regulação da produção de hepcidina e envolve inúmeras outras vias moleculares, como a formação óssea(124,125), o seu desenvolvimento e globalização do seu uso deverá ter em conta os possíveis efeitos sistêmicos negativos(124,126).

Por último, outro possível composto é a isoflavona genisteína, a qual promove a transcrição da hepcidina através da via JAK-STAT3 e BMP-SMAD4. Não obstante, a sua eficácia *in vivo* ainda não está demonstrada(127).

## Antagonistas

A concentração sérica de hepcidina encontra-se patologicamente elevada em diversas situações abordadas anteriormente. Geralmente, o tratamento da anemia nestas patologias baseia-se nos ESA com ou sem ferro intravenoso. Apesar da totalidade dos efeitos adversos a longo prazo não estar descrita, alguns dependentes da dose estão descritos(128). Ao baixar a produção de hepcidina, os antagonistas permitem reduzir as doses dos fármacos em uso atualmente. Os locais de ação deste grupo de fármacos encontram-se sintetizados na figura 2.

### Classe 1 – Supressão da produção de hepcidina

Dos reguladores da síntese de hepcidina, os principais alvos estudados para fins terapêuticos são os BMPs, o ambiente inflamatório e a eritropoiese.

As heparinas são moléculas bem caracterizadas e com um elevado grau de utilização. Estas têm propriedades anti-inflamatórias, uma vez que apresentam capacidade de ligação e inibição dos BMPs(129). No entanto, globalmente, a sua principal utilização refere-se à sua ação anticoagulante, o que questiona a sua utilização como inibidor da hepcidina. Por essa razão, foi desenvolvido um composto semelhante às heparinas, mas sem atividade anticoagulante. Deste modo, é possível garantir a supressão da síntese de hepcidina e permitir o seu uso a longo prazo, através da inibição do principal efeito adverso. A utilização deste composto já foi avaliada em modelos *in vitro* e *in vivo*(130).

Tendo em conta a capacidade de supressão da via BMP-SMAD4 pela sHJV, foi desenvolvida a proteína de fusão sHJV-FC (FMX-8), que tem a capacidade de inibir a expressão de hepcidina e tratar a anemia de doença crónica em modelos *in vivo*(70,131). Embora tenham

sido iniciados ensaios clínicos para anemia associada a doença renal crônica, estes não foram concluídos(132,133). Do mesmo modo, dois anticorpos monoclonais ABT-207 e h5F9-AM8, cujo alvo terapêutico é a HJV, demonstraram eficácia e bom perfil de segurança em modelos animais, o que possibilita a sua possível utilização futura em ensaios clínicos(134).

A inibição do recetor do BMP tipo I é outra estratégia molecular e terapêutica a considerar. A molécula desenvolvida LDN-193189/Dorsomorfina é um exemplo disso(135). Estudos *in vivo* demonstraram eficácia no tratamento de anemia de doença crônica, com diminuição da síntese de hepcidina, aumento do ferro sérico e reversão do quadro clínico(59). Outros estudos *in vivo* demonstraram resultados semelhantes com aumento do ferro sérico e mobilização do ferro a partir do baço, embora sem melhoria clínica associada(136). Devido à multiplicidade de vias fisiológicas associadas aos BMPs, o impacto do seu bloqueio ainda não é totalmente conhecido e o próximo passo no desenvolvimento destes compostos é a criação de um antagonista específico do BMP6 associado à síntese de hepcidina.

Os AEE em doses elevadas podem ultrapassar a resistência à eritropoietina, parcialmente através da supressão da hepcidina(76). No entanto, esta estratégia terapêutica não é recomendável, dado o aumento significativo de efeitos adversos associados(128).

Outros compostos também foram alvo de vários estudos, nomeadamente antagonistas da IL-6, tal como o siltuximab(137) e tocilizumab(138,139), anti-TNF $\alpha$ (140) e inibidores da via molecular JAK2-STAT3(141,142). Apesar da resposta positiva observada em estudos *in vitro* e *in vivo*, estas moléculas são responsáveis pela resposta inflamatória a vários estímulos, nomeadamente o combate a infeções. Por essa razão, o seu uso poderá ser recomendado apenas nas patologias inflamatórias severas.

Por fim, novos alvos moleculares estão em desenvolvimento, nomeadamente o mRNA da hepcidina, da HJV, o transportador TfR2 e o HIF, através da utilização de siRNA e ASO (143–145). Dada a produção maioritária de hepcidina pelo fígado, a retenção destes compostos a este nível seria uma vantagem acrescida para a sua utilização.

## Classe 2 – Neutralização da hepcidina

A inibição da hepcidina foi estudada através da ligação direta de três compostos distintos: anticorpos monoclonais, anticalinas e *spiegelmers*.

Os anticorpos monoclonais aumentam a sensibilidade à eritropoietina e previnem o desenvolvimento de anemia quando associados a um AEE em estudos *in vivo*(146). Atualmente, o anticorpo humanizado LY2787106 foi desenvolvido para tratamento da anemia associado a neoplasias. Terminou o ensaio clínico de fase I em dezembro de 2014(147). No entanto, o desenvolvimento desta molécula foi interrompido.

As anticalinas são derivados proteicos das lipocalinas modificados para se ligar e antagonizar determinados alvos terapêuticos(148). A PRS-080 foi desenvolvida para se ligar à hepcidina humana, mas ainda são desconhecidos os seus padrões de segurança e eficácia terapêutica. O primeiro ensaio clínico de fase I terminou em agosto de 2015 e não tem ainda resultados publicados(149).

Os *spiegelmers* são oligonucleótidos *Ribonucleic Acid-like (RNA-like)* resistentes a nucleases, com maior estabilidade em circulação e um alvo terapêutico específico. O Lexaptetid Pegol (NOX-H94) tem ação anti-hepcidina, o qual, em modelos *in vivo*, demonstrou prevenir o desenvolvimento de anemia, uma vez que impedia a degradação da ferroportina pela hepcidina(150). Este completou inicialmente um estudo combinado com doses única e múltipla. Neste estudo, este fármaco foi globalmente seguro e bem tolerado. Foi demonstrada uma correlação linear dose-dependente entre a exposição ao fármaco e o aumento dos parâmetros da dinâmica do ferro (151). Posteriormente, foi testado num estudo randomizado duplamente cego e controlado por placebo, no qual 24 homens jovens e saudáveis recebiam uma baixa dose de lipopolissacarídeo associado a uma dose única de NOX-H94 ou placebo. No grupo de placebo, foi detetada uma diminuição transitória dos níveis de ferro sérico, possivelmente associada à produção da IL-6. Por outro lado, no grupo administrado com NOX-H94, foi observada um aumento do ferro sérico significativo(152). Noutro estudo em 64 indivíduos saudáveis, verificou-se um aumento da concentração de ferro sérico e de transferrina dose-dependente após tratamento com Lexaptetid. O fármaco foi bem tolerado e seguro(153). Num estudo piloto, também foi demonstrada eficácia num conjunto de doentes com neoplasia e anemia associada ao défice funcional de ferro(154). Os estudos de fase IIa estão em desenvolvimento nos doentes dialisados com anemia refratária a AEE(155).

O principal fator limitativo da utilização deste tipo de composto é a elevada quantidade de hepcidina produzida diariamente. Por outro lado, a ligação a estas moléculas poderá diminuir a capacidade de excreção da hepcidina e aumentar a sua retenção, embora a diminuição do tempo de semivida destes compostos ou a promoção da reciclagem dos anticorpos possa solucionar este problema.

### Classe 3 – Interferência com a ligação hepcidina-ferroportina

A fursultiamina é responsável pelo bloqueio do resíduo da ferroportina Cys326-SH, o qual é necessário para a sua ligação à hepcidina. A sua eficácia foi apenas observada *in vitro* e, dada a sua reduzida semivida, não foi possível observar alterações na concentração de ferro sérico. Para além disso, a fursultiamina apresenta reatividade com os tiois, o que pode gerar reações cruzadas e efeitos indesejados(156).

O anticorpo monoclonal humanizado anti-ferroportina LY2928057 liga-se ao mesmo resíduo da ferroportina sem interferir com a capacidade de efluxo de ferro através da ferroportina. Foi verificado o aumento do ferro sérico de forma dose-dependente em macacos cinomolgos(157). Um ensaio clínico de fase I terminou em setembro de 2011(158) e outro ensaio clínico de fase I direcionado aos doentes hemodialisados terminou em novembro de 2015(159). Os resultados de ambos os estudos ainda não foram publicados.

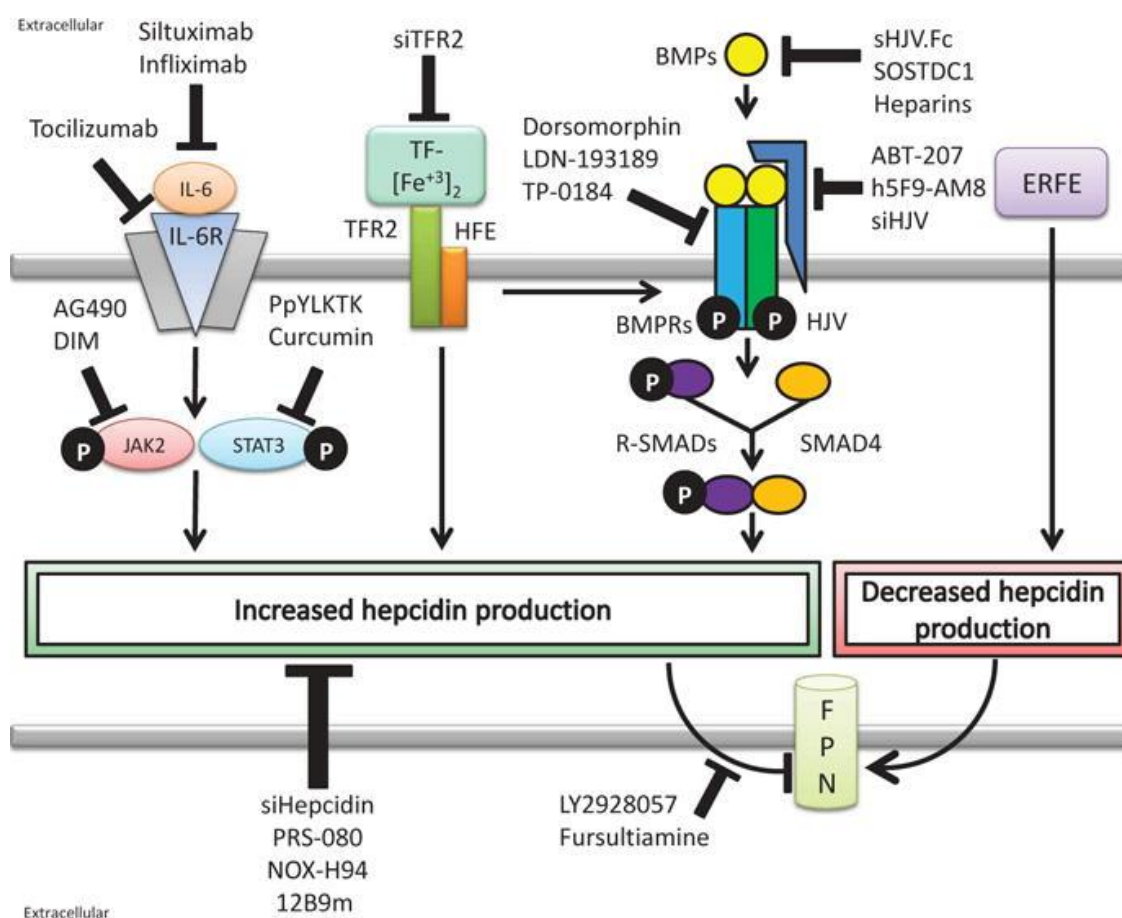


Figura 2: Antagonistas da hepcidina (160)

## CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O papel regulador da hepcidina no metabolismo do ferro é inequívoco atualmente. A modulação da sua concentração garante uma capacidade fisiológica de resposta aos múltiplos estímulos internos e externos ao ser humano. São cada vez mais as patologias onde a hepcidina apresenta uma influência significativa na sua fisiopatologia.

O conhecimento do metabolismo do ferro e da regulação da hepcidina afigura-se cada vez mais importante para a abordagem destas patologias e o seu tratamento. No entanto, o doseamento da hepcidina ainda não está acessível para a maioria dos centros e o seu doseamento ainda se encontra reservado para fins investigacionais.

A potencial modulação da hepcidina permitirá alterar a história natural de várias doenças e eventualmente a sua cura, pelo menos sintomática. Várias moléculas têm sido estudadas, mas ainda nenhuma está disponível para uso na prática clínica. Todos os fármacos em desenvolvimento encontram-se em fases pré-clínica ou precoces dos ensaios clínicos.

O desenvolvimento de métodos de deteção da hepcidina, fáceis e pouco onerosos, que permitam a sua análise na prática clínica, bem como o desenvolvimento de fármacos moduladores terão seguramente um impacto significativo no conhecimento, abordagem e seguimento de múltiplas patologias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*. Outubro de 2001;33(10):940–59.
2. Watt RK, Hilton RJ, Graff DM. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim Biophys Acta*. Agosto de 2010;1800(8):745–59.
3. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15 de Janeiro de 2005;202(2):199–211.
4. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 de Fevereiro de 2005;102(5):1324–8.
5. Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 de Setembro de 1997;94(20):10919–24.
6. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol*. Abril de 2011;64(4):281–6.
7. Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis*. Dezembro de 2002;29(3):336–55.
8. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. 2 de Março de 2001;291(5509):1755–9.
9. Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*. 15 de Agosto de 2006;108(4):1388–94.
10. Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Hainsworth LN, Porubcin M, Simovich MJ, et al. Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Outubro de 2000;279(4):G767-774.
11. Umbreit JN, Conrad ME, Hainsworth LN, Simovich M. The ferrireductase paraferitin contains divalent metal transporter as well as mobilferrin. *Am J Physiol Gastrointest Liver*



Physiol. Março de 2002;282(3):G534-539.

12. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 9 de Setembro de 2005;122(5):789–801.
13. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 1 de Dezembro de 2006;127(5):917–28.
14. Hou S, Reynolds MF, Horrigan FT, Heinemann SH, Hoshi T. Reversible binding of heme to proteins in cellular signal transduction. *Acc Chem Res*. Dezembro de 2006;39(12):918–24.
15. Ma Y, Yeh M, Yeh K-Y, Glass J. Iron Imports. V. Transport of iron through the intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Março de 2006;290(3):G417-422.
16. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. Fevereiro de 2000;5(2):299–309.
17. Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 de Setembro de 1999;96(19):10812–7.
18. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*. Fevereiro de 1999;21(2):195–9.
19. Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 de Abril de 2003;100(7):3579–83.
20. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta*. Março de 2012;1820(3):403–10.
21. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. Outubro de 1999;31(10):1111–37.
22. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, et al.

Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet.* Novembro de 2005;37(11):1264–9.

23. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 de Setembro de 2006;103(37):13612–7.

24. Hider RC, Kong XL. Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* Dezembro de 2011;24(6):1179–87.

25. Andrews NC. Probing the iron pool. Focus on «Detection of intracellular iron by its regulatory effect». *Am J Physiol Cell Physiol.* Dezembro de 2004;287(6):C1537-1538.

26. Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. *Free Radic Biol Med.* 1 de Junho de 2011;50(11):1647–58.

27. Asano T, Komatsu M, Yamaguchi-Iwai Y, Ishikawa F, Mizushima N, Iwai K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol Cell Biol.* Maio de 2011;31(10):2040–52.

28. Alkhateeb AA, Connor JR. Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. *Biochim Biophys Acta.* Agosto de 2010;1800(8):793–7.

29. Fujiwara T, Harigae H. Update on the biology of heme synthesis in erythroid cells. *Rinshō Ketsueki Jpn J Clin Hematol.* 2015;56(2):119–27.

30. Bou-Abdallah F, Santambrogio P, Levi S, Arosio P, Chasteen ND. Unique iron binding and oxidation properties of human mitochondrial ferritin: a comparative analysis with Human H-chain ferritin. *J Mol Biol.* 1 de Abril de 2005;347(3):543–54.

31. Nie G, Chen G, Sheftel AD, Pantopoulos K, Ponka P. In vivo tumor growth is inhibited by cytosolic iron deprivation caused by the expression of mitochondrial ferritin. *Blood.* 1 de Outubro de 2006;108(7):2428–34.

32. Fisher J, Devraj K, Ingram J, Slagle-Webb B, Madhankumar AB, Liu X, et al. Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *Am J Physiol Cell Physiol.* Agosto de 2007;293(2):C641-649.

33. Ozaki M, Kawabata T, Awai M. Iron release from haemosiderin and production of iron-

catalysed hydroxyl radicals in vitro. *Biochem J.* 1 de Março de 1988;250(2):589–95.

34. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 1 de Setembro de 2000;480(2–3):147–50.

35. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 16 de Março de 2001;276(11):7806–10.

36. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 16 de Março de 2001;276(11):7811–9.

37. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 de Julho de 2001;98(15):8780–5.

38. Piperno A, Mariani R, Trombini P, Girelli D. Hepcidin modulation in human diseases: From research to clinic. *World J Gastroenterol WJG.* 7 de Fevereiro de 2009;15(5):538–51.

39. Pinto JP, Dias V, Zoller H, Porto G, Carmo H, Carvalho F, et al. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology.* Junho de 2010;130(2):217–30.

40. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis.* Janeiro de 2008;40(1):132–8.

41. Gagliardo B, Kubat N, Faye A, Jaouen M, Durel B, Deschemin J-C, et al. Pro-hepcidin is unable to degrade the iron exporter ferroportin unless matured by a furin-dependent process. *J Hepatol.* Fevereiro de 2009;50(2):394–401.

42. Barthe C, Hocquellet A, Garbay B. Bacteriostatic activity of the proregion of human hepcidin. *Protein Pept Lett.* Janeiro de 2011;18(1):36–40.

43. Nicolae C, Coman O, Ene C, Nicolae I, Fulga I. Hepcidin in neoplastic disease. *J Med Life.* 15 de Setembro de 2013;6(3):355–60.

44. Schmidt PJ. Regulation of Iron Metabolism by Hepcidin under Conditions of Inflammation. *J Biol Chem.* 31 de Julho de 2015;290(31):18975–83.

45. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*. 17 de Dezembro de 2004;306(5704):2090–3.
46. Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez M-J, Ganz T, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab*. 6 de Junho de 2012;15(6):918–24.
47. Parrow NL, Fleming RE. Bone morphogenetic proteins as regulators of iron metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:77–94.
48. Camaschella C, Silvestri L. Molecular mechanisms regulating hepcidin revealed by hepcidin disorders. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:1357–66.
49. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. Maio de 2006;38(5):531–9.
50. Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet*. Abril de 2009;41(4):482–7.
51. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. Dezembro de 2008;8(6):502–11.
52. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. Março de 2008;7(3):205–14.
53. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*. Abril de 2011;53(4):1333–41.
54. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. Maio de 2004;113(9):1271–6.
55. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3.

Blood. 1 de Novembro de 2006;108(9):3204–9.

56. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. Blood. 1 de Abril de 2003;101(7):2461–3.

57. Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. Blood. 1 de Janeiro de 2007;109(1):353–8.

58. Wang R-H, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. Cell Metab. Dezembro de 2005;2(6):399–409.

59. Steinbicker AU, Sachidanandan C, Vonner AJ, Yusuf RZ, Deng DY, Lai CS, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. Blood. 5 de Maio de 2011;117(18):4915–23.

60. Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth M-P, et al. Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. Blood. 12 de Julho de 2012;120(2):431–9.

61. Roy CN, Custodio AO, de Graaf J, Schneider S, Akpan I, Montross LK, et al. An Hfe-dependent pathway mediates hyposideremia in response to lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. Nat Genet. Maio de 2004;36(5):481–5.

62. Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E. The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 22 de Junho de 2004;101(25):9263–5.

63. Wallace DF, McDonald CJ, Ostini L, Subramaniam VN. Blunted hepcidin response to inflammation in the absence of Hfe and transferrin receptor 2. Blood. 10 de Março de 2011;117(10):2960–6.

64. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. J Clin Invest. Outubro de 2002;110(7):1037–44.

65. Young B, Zaritsky J. Hepcidin for clinicians. Clin J Am Soc Nephrol CJASN. Agosto de

2009;4(8):1384–7.

66. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* 30 de Maio de 2012;31(11):2448–60.

67. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest.* Julho de 2007;117(7):1926–32.

68. Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaud C. HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest.* Maio de 2009;119(5):1159–66.

69. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood.* 15 de Janeiro de 2008;111(2):924–31.

70. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest.* Julho de 2007;117(7):1933–9.

71. Maurer E, Gütschow M, Stirnberg M. Matriptase-2 (TMPRSS6) is directly up-regulated by hypoxia inducible factor-1: identification of a hypoxia-responsive element in the TMPRSS6 promoter region. *Biol Chem.* Maio de 2012;393(6):535–40.

72. Lakhal S, Schödel J, Townsend ARM, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: new link between hypoxia signaling and iron homeostasis. *J Biol Chem.* 11 de Fevereiro de 2011;286(6):4090–7.

73. Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Demetz E, et al. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut.* Dezembro de 2014;63(12):1951–9.

74. Patel N, Varghese J, Masaratana P, Latunde-Dada GO, Jacob M, Simpson RJ, et al. The transcription factor ATOH8 is regulated by erythropoietic activity and regulates HAMP transcription and cellular pSMAD1,5,8 levels. *Br J Haematol.* Fevereiro de 2014;164(4):586–96.

75. Volke M, Gale DP, Maegdefrau U, Schley G, Klanke B, Bosserhoff A-K, et al. Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. *PloS One*. 2009;4(11):e7875.
76. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*. Março de 2010;95(3):505–8.
77. Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov*. 2006;55(6):667–74.
78. Sasaki Y, Noguchi-Sasaki M, Yasuno H, Yorozu K, Shimonaka Y. Erythropoietin stimulation decreases hepcidin expression through hematopoietic activity on bone marrow cells in mice. *Int J Hematol*. Dezembro de 2012;96(6):692–700.
79. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh S-H, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*. Setembro de 2007;13(9):1096–101.
80. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh S-J, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*. 2 de Julho de 2009;114(1):181–6.
81. Casanovas G, Vujić Spasic M, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K, et al. The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica*. Março de 2013;98(3):444–7.
82. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. IDENTIFICATION OF ERYTHROFERRONE AS AN ERYTHROID REGULATOR OF IRON METABOLISM. *Nat Genet*. Julho de 2014;46(7):678–84.
83. Goodnough JB, Ramos E, Nemeth E, Ganz T. Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatol Baltim Md*. Julho de 2012;56(1):291–9.
84. Yang Q, Jian J, Katz S, Abramson SB, Huang X. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits iron hormone hepcidin through an estrogen responsive element half-site. *Endocrinology*. Julho de 2012;153(7):3170–8.
85. Ikeda Y, Tajima S, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, et al. Estrogen

regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes. *PloS One*. 2012;7(7):e40465.

86. Bachman E, Feng R, Travison T, Li M, Olbina G, Ostland V, et al. Testosterone suppresses hepcidin in men: a potential mechanism for testosterone-induced erythrocytosis. *J Clin Endocrinol Metab*. Outubro de 2010;95(10):4743–7.

87. Guo W, Bachman E, Li M, Roy CN, Blusztajn J, Wong S, et al. Testosterone administration inhibits hepcidin transcription and is associated with increased iron incorporation into red blood cells. *Aging Cell*. Abril de 2013;12(2):280–91.

88. Mleczko-Sanecka K, Roche F, da Silva AR, Call D, D'Alessio F, Ragab A, et al. Unbiased RNAi screen for hepcidin regulators links hepcidin suppression to proliferative Ras/RAF and nutrient-dependent mTOR signaling. *Blood*. 6 de Março de 2014;123(10):1574–85.

89. Konz T, Montes-Bayón M, Vaulont S. Hepcidin quantification: methods and utility in diagnosis. *Met Integr Biometal Sci*. Setembro de 2014;6(9):1583–90.

90. Camaschella C, Poggiali E. Rare types of genetic hemochromatosis. *Acta Haematol*. 2009;122(2–3):140–5.

91. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 de Abril de 2002;99(7):4596–601.

92. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*. 15 de Novembro de 2002;100(10):3776–81.

93. Means RT. The anaemia of infection. *Baillières Best Pract Res Clin Haematol*. Junho de 2000;13(2):151–62.

94. Maes K, Nemeth E, Roodman GD, Huston A, Esteve F, Freytes C, et al. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood*. 4 de Novembro de 2010;116(18):3635–44.

95. Wang S-J, Gao C, Chen B-A. Advancement of the study on iron metabolism and regulation in tumor cells. *Chin J Cancer*. Abril de 2010;29(4):451–5.



96. Orlandi R, De Bortoli M, Ciniselli CM, Vaghi E, Caccia D, Garrisi V, et al. Hepcidin and ferritin blood level as noninvasive tools for predicting breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. Fevereiro de 2014;25(2):352–7.
97. Durigova A, Lamy P-J, Thezenas S, Pouderoux S, Montels F, Romieu G, et al. Anemia and iron biomarkers in patients with early breast cancer. Diagnostic value of hepcidin and soluble transferrin receptor quantification. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC*. Setembro de 2013;51(9):1833–41.
98. Christiansen H, Saile B, Hermann RM, Rave-Fränk M, Hille A, Schmidberger H, et al. Increase of hepcidin plasma and urine levels is associated with acute proctitis and changes in hemoglobin levels in primary radiotherapy for prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. Maio de 2007;133(5):297–304.
99. Steegmann-Olmedillas JL. The role of iron in tumour cell proliferation. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. Fevereiro de 2011;13(2):71–6.
100. Stadler N, Lindner RA, Davies MJ. Direct Detection and Quantification of Transition Metal Ions in Human Atherosclerotic Plaques: Evidence for the Presence of Elevated Levels of Iron and Copper. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 5 de Janeiro de 2004;24(5):949–54.
101. Meyers DG. The iron hypothesis--does iron cause atherosclerosis? *Clin Cardiol*. Dezembro de 1996;19(12):925–9.
102. Salonen JT, Nyyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation*. Setembro de 1992;86(3):803–11.
103. Franco RF, Zago MA, Trip MD, ten Cate H, van den Ende A, Prins MH, et al. Prevalence of hereditary haemochromatosis in premature atherosclerotic vascular disease. *Br J Haematol*. Setembro de 1998;102(5):1172–5.
104. Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med* Maywood NJ. Setembro de 2007;232(8):1014–20.
105. Pankow JS, Boerwinkle E, Adams PC, Guallar E, Leiendecker-Foster C, Rogowski J, et al. HFE C282Y homozygotes have reduced LDL cholesterol: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Transl Res J Lab Clin Med*. Julho de 2008;152(1):3–10.

106. Miller M, Hutchins GM. HEmochromatosis, multiorgan hemosiderosis, and coronary artery disease. *JAMA*. 20 de Julho de 1994;272(3):231–3.
107. Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. Abril de 2010;55(4):726–41.
108. Kossiva L, Soldatou A, Gourgiotis DI, Stamati L, Tsentidis C. Serum hepcidin: indication of its role as an «acute phase» marker in febrile children. *Ital J Pediatr*. 2013;39:25.
109. Arabul M, Celik M, Aslan O, Torun S, Beyazit Y, Alper E, et al. Hepcidin as a predictor of disease severity in acute pancreatitis: a single center prospective study. *Hepatogastroenterology*. Maio de 2013;60(123):595–600.
110. Wu T-W, Tabangin M, Kusano R, Ma Y, Ridsdale R, Akinbi H. The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis. *J Pediatr*. Janeiro de 2013;162(1):67–71.
111. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. Setembro de 2006;131(3):788–96.
112. Ziemann E, Kasprowicz K, Kasperska A, Zembroń-Lacny A, Antosiewicz J, Laskowski R. Do high blood hepcidin concentrations contribute to low ferritin levels in young tennis players at the end of tournament season? *J Sports Sci Med*. 2013;12(2):249–58.
113. Kasprowicz K, Ziemann E, Ratkowski W, Laskowski R, Kaczor JJ, Dadci R, et al. Running a 100-km ultra-marathon induces an inflammatory response but does not raise the level of the plasma iron-regulatory protein hepcidin. *J Sports Med Phys Fitness*. Outubro de 2013;53(5):533–7.
114. Aregbesola A, Voutilainen S, Virtanen JK, Aregbesola A, Tuomainen T-P. Serum hepcidin concentrations and type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 10 de Julho de 2015;6(7):978–82.
115. Kanbay A, Hasanoglu HC. A new prognostic marker for obstructive sleep apnea: hepcidin. *Med Hypotheses*. 2007;69(6):1381–2.
116. Gardenghi S, Ramos P, Marongiu MF, Melchiori L, Breda L, Guy E, et al. Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in  $\beta$ -thalassemic mice. *J Clin*

Invest. Dezembro de 2010;120(12):4466–77.

117. Preza GC, Ruchala P, Pinon R, Ramos E, Qiao B, Peralta MA, et al. Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest.* Dezembro de 2011;121(12):4880–8.

118. Ramos E, Ruchala P, Goodnough JB, Kautz L, Preza GC, Nemeth E, et al. Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis. *Blood.* 1 de Novembro de 2012;120(18):3829–36.

119. dbadmin. Development Compound: M012 [Internet]. Merganser Biotech. [citado 8 de Maio de 2016]. Obtido de: <http://merganserbiotech.com/hepcidin-mimetic-peptides/development-compound-m012/>

120. Nai A, Pagani A, Mandelli G, Lidonnici MR, Silvestri L, Ferrari G, et al. Deletion of TMPRSS6 attenuates the phenotype in a mouse model of  $\beta$ -thalassemia. *Blood.* 24 de Maio de 2012;119(21):5021–9.

121. Guo S, Casu C, Gardenghi S, Booten S, Aghajan M, Peralta R, et al. Reducing TMPRSS6 ameliorates hemochromatosis and  $\beta$ -thalassemia in mice. *J Clin Invest.* Abril de 2013;123(4):1531–41.

122. Schmidt PJ, Toudjarska I, Sendamarai AK, Racie T, Milstein S, Bettencourt BR, et al. An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe(-/-) mice and ameliorates anemia and iron overload in murine  $\beta$ -thalassemia intermedia. *Blood.* 14 de Fevereiro de 2013;121(7):1200–8.

123. Fishman S, Racie T, Hettinger J, Bettencourt BR, Charisse K, Fitzgerald K. Aln-TMP: A Subcutaneously Administered RNAi Therapeutic Targeting Tmprss6 For The Treatment Of  $\beta$ -Thalassemia. *Blood.* 15 de Novembro de 2013;122(21):2260–2260.

124. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth M-P. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet.* Abril de 2009;41(4):478–81.

125. Corradini E, Schmidt PJ, Meynard D, Garuti C, Montosi G, Chen S, et al. BMP6 treatment compensates for the molecular defect and ameliorates hemochromatosis in Hfe knockout mice. *Gastroenterology.* Novembro de 2010;139(5):1721–9.

126. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J Off J North Am Spine Soc.* Junho de 2011;11(6):471–91.
127. Zhen AW, Nguyen NH, Gibert Y, Motola S, Buckett P, Wessling-Resnick M, et al. The small molecule, genistein, increases hepcidin expression in human hepatocytes. *Hepatology Baltim Md.* Outubro de 2013;58(4):1315–25.
128. Bennett CL, Spiegel DM, Macdougall IC, Norris L, Qureshi ZP, Sartor O, et al. A review of safety, efficacy, and utilization of erythropoietin, darbepoetin, and peginesatide for patients with cancer or chronic kidney disease: a report from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR). *Semin Thromb Hemost.* Novembro de 2012;38(8):783–96.
129. Poli M, Girelli D, Campostrini N, Maccarinelli F, Finazzi D, Luscieti S, et al. Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood.* 20 de Janeiro de 2011;117(3):997–1004.
130. Poli M, Asperti M, Naggi A, Campostrini N, Girelli D, Corbella M, et al. Glycol-split nonanticoagulant heparins are inhibitors of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood.* 6 de Março de 2014;123(10):1564–73.
131. Theurl I, Schroll A, Sonnweber T, Nairz M, Theurl M, Willenbacher W, et al. Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic inflammation in rats. *Blood.* 3 de Novembro de 2011;118(18):4977–84.
132. An Exploratory Study to Evaluate FMX-8 to Treat Anemia in CKD - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 8 de Maio de 2016]. Obtido de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02228655?term=fmx-8&rank=2>
133. A Phase 2A Trial of FMX-8 Treatment for Anemia in Patients With ESRD on Hemodialysis HD - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 8 de Maio de 2016]. Obtido de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01873534?term=fmx-8&rank=1>
134. Böser P, Seemann D, Liguori MJ, Fan L, Huang L, Hafner M, et al. Anti-repulsive Guidance Molecule C (RGMc) Antibodies Increases Serum Iron in Rats and Cynomolgus Monkeys by Hepcidin Downregulation. *AAPS J.* Julho de 2015;17(4):930–8.
135. Cuny GD, Yu PB, Laha JK, Xing X, Liu J-F, Lai CS, et al. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 1 de

Agosto de 2008;18(15):4388–92.

136. Sun CC, Vaja V, Chen S, Theurl I, Stepanek A, Brown DE, et al. A hepcidin lowering agent mobilizes iron for incorporation into red blood cells in an adenine-induced kidney disease model of anemia in rats. *Nephrol Dial Transplant*. Julho de 2013;28(7):1733–43.

137. A phase 2, open-label, multicenter study of the long-term safety of siltuximab (an anti-interleukin-6 monoclonal antibody) in patients with multicentric Castleman disease | Rhee | *Oncotarget* [Internet]. [citado 3 de Janeiro de 2016]. Obtido de: [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=4655&pubmed-linkout=1](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=4655&pubmed-linkout=1)

138. Song S-NJ, Tomosugi N, Kawabata H, Ishikawa T, Nishikawa T, Yoshizaki K. Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman disease. *Blood*. 4 de Novembro de 2010;116(18):3627–34.

139. Isaacs JD, Harari O, Kobold U, Lee JS, Bernasconi C. Effect of tocilizumab on haematological markers implicates interleukin-6 signalling in the anaemia of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):R204.

140. Song S-NJ, Iwahashi M, Tomosugi N, Uno K, Yamana J, Yamana S, et al. Comparative evaluation of the effects of treatment with tocilizumab and TNF- $\alpha$  inhibitors on serum hepcidin, anemia response and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R141.

141. Fatih N, Camberlein E, Island ML, Corlu A, Abgueguen E, Détiavaud L, et al. Natural and synthetic STAT3 inhibitors reduce hepcidin expression in differentiated mouse hepatocytes expressing the active phosphorylated STAT3 form. *J Mol Med Berl Ger*. Maio de 2010;88(5):477–86.

142. Zhang S-P, Wang Z, Wang L-X, Liu S-J. AG490: An inhibitor of hepcidin expression in vivo. *World J Gastroenterol WJG*. 7 de Dezembro de 2011;17(45):5032–4.

143. Querbes W, Bogorad RL, Moslehi J, Wong J, Chan AY, Bulgakova E, et al. Treatment of erythropoietin deficiency in mice with systemically administered siRNA. *Blood*. 30 de Agosto de 2012;120(9):1916–22.

144. Besarab A, Chernyavskaya E, Motylev I, Shutov E, Kumbar LM, Gurevich K, et al.

Roxadustat (FG-4592): Correction of Anemia in Incident Dialysis Patients. J Am Soc Nephrol. 22 de Outubro de 2015;ASN.2015030241.

145. Peterson PW. Abstract 3647: Targeting cancer-induced anemia with hepcidin lowering ALK2 inhibitors. Cancer Res. 8 de Janeiro de 2015;75(15 Supplement):3647–3647.

146. Sasu BJ, Cooke KS, Arvedson TL, Plewa C, Ellison AR, Sheng J, et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. Blood. 29 de Abril de 2010;115(17):3616–24.

147. A Phase 1 Study of LY2787106 in Cancer and Anemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 31 de Dezembro de 2015]. Obtido de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01340976?term=NCT01340976&rank=1>

148. Skerra A. Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. FEBS J. Junho de 2008;275(11):2677–83.

149. First-in-Human Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of PRS-080 - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 31 de Dezembro de 2015]. Obtido de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02340572?term=prs-080&rank=1>

150. Schwoebel F, van Eijk LT, Zboralski D, Sell S, Buchner K, Maasch C, et al. The effects of the anti-hepcidin Spiegelmer NOX-H94 on inflammation-induced anemia in cynomolgus monkeys. Blood. 21 de Março de 2013;121(12):2311–5.

151. Paper: Single and Repeated Dose First-in-Human Study with the Anti-Hepcidin Spiegelmer Nox-H94 [Internet]. [citado 10 de Abril de 2016]. Obtido de: <https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper52683.html>

152. Paper: Randomized Double Blind Placebo Controlled PK/PD Study On the Effects of a Single Intravenous Dose of the Anti-Hepcidin Spiegelmer Nox-H94 On Serum Iron During Experimental Human Endotoxemia [Internet]. [citado 10 de Abril de 2016]. Obtido de: <https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper50672.html>

153. Boyce M, Warrington S, Cortezi B, Zöllner S, Vauléon S, Swinkels DW, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-hepcidin Spiegelmer lexaptepid pegol in healthy subjects. Br J Pharmacol. 15 de Janeiro de 2016;

154. Efficacy of NOX-H94 on Anemia of Chronic Disease in Patients With Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 31 de Dezembro de 2015]. Obtido de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01691040?term=nox-h94&rank=4>
155. First-in-human Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of NOX-H94 - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 31 de Dezembro de 2015]. Obtido de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01372137?term=nox-h94&rank=1>
156. Fung E, Sugianto P, Hsu J, Damoiseaux R, Ganz T, Nemeth E. High-throughput screening of small molecules identifies hepcidin antagonists. *Mol Pharmacol*. Março de 2013;83(3):681–90.
157. Leung D, Hill KA, Rosa DCD, Xu J, Manetta J, Wroblewski VJ, et al. LY2928057, An Antibody Targeting Ferroportin, Is a Potent Inhibitor Of Hepcidin Activity and Increases Iron Mobilization In Normal Cynomolgus Monkeys. *Blood*. 15 de Novembro de 2013;122(21):3433–3433.
158. A First Human Study of a Ferroportin Antibody - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 31 de Dezembro de 2015]. Obtido de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01330953?term=NCT01330953&rank=1>
159. A Study of LY2928057 in Hemodialysis Participants - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 10 de Abril de 2016]. Obtido de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01991483?term=LY2928057&rank=1>
160. Blanchette NL, Manz DH, Torti FM, Torti SV. Modulation of hepcidin to treat iron deregulation: potential clinical applications. *Expert Rev Hematol*. Fevereiro de 2016;9(2):169–86.